



Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer

Eindverslag 2010 - 2013

Jürgen Köhl, Pieter Kastelein, Lia Groenenboom-de Haas, Henny Balkhoven,
Jos Wubben en Peter Veenhuizen





Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer

Eindverslag 2010 - 2013

Jürgen Köhl¹, Pieter Kastelein¹, Lia Groenenboom-de Haas¹, Henny Balkhoven²,
Jos Wubben³ en Peter Veenhuizen³

¹ Plant Research International

² Fruitconsult, Postbus 70, 6670 AB Zetten

³ BLGG Research, Postbus 170, 6700 AD Wageningen

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Bio-interacties en Plantgezondheid.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.



Projectnummer: 3340065500
Projectnummer PT: 14001

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bio-interacties en Plantgezondheid

Adres : Postbus 69, 6700 AB Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 05 94
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR/nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Doelstelling	7
3. Materiaal en methode	9
3.1 Keuze percelen	9
3.2 Bemonstering en waarnemingen	9
3.3 DNA analyse	10
4. Resultaten	11
4.1 Bemonstering en monsteropwerking	11
4.2 Toetsing van voorjaarsmonsters op DNA van <i>Stemphylium vesicarium</i>	11
4.3 Ziektewaarnemingen voor de oogst	11
4.4 Verband tussen concentraties <i>Stemphylium vesicarium</i> DNA in voorjaarsmonsters en ziektewaarnemingen	12
5. Discussie en conclusies	17
6. Producten opgeleverd gedurende het project	19
7. Literatuur	21

Samenvatting

Zwartvruchtrot van peer wordt veroorzaakt door *Stemphylium vesicarium*. De schimmel kan zowel vruchten als bladeren aantasten. Verscheidene experimenten hebben aangetoond dat in boomgaarden op de grond liggende infectiebronnen een belangrijke rol spelen in de epidemiologie van zwartvruchtrot van peer. Geïnfecteerde plantenresten worden beschouwd als continue bron van sporen die gedurende het gehele groeiseizoen infecties kunnen veroorzaken op bladeren en vruchten.

Bepaalde stammen van de schimmel kunnen op een breed scala van gewassen, zoals peer, ui en asperge, ziekte veroorzaken, maar isolaten van *Stemphylium vesicarium* uit aangetaste asperges en uien veroorzaken geen symptomen op peer. Het DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* isolaten kan van het DNA van andere *Stemphylium vesicarium* isolaten worden onderscheiden en er is een kwantitatieve PCR-toets ontwikkeld voor peer-pathogene isolaten van *Stemphylium vesicarium*. Deze toets kan worden gebruikt om de hoeveelheid peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* te bepalen in veldmonsters.

Zwartvruchtrot treedt in de Nederlandse perenteelt alleen in enkele boomgaarden op (ongeveer 5 % van het areaal), maar het optreden van de ziekte is niet voorspelbaar en zware aantastingen treden elk jaar weer op in percelen waarin dat niet verwacht wordt. Dit heeft tot gevolg dat op het gehele areaal preventief zware spuitschema's worden gehandhaafd. In het project is de toepassing van de door PRI ontwikkelde PCR-toets onderzocht met als doel een onderscheid te kunnen maken tussen percelen met een laag en een hoog risico met betrekking tot het optreden van zwartvruchtrot.

In 2010 en 2011 werden respectievelijk 78 en 92 percelen peer van cv. Conference geselecteerd in boomgaarden verspreid over verschillende fruitteeltregio's in Nederland. In 2012 werden in dezelfde regio's 88 percelen onderzocht. Daarnaast werden in 2012 in de grensstreek ten noordwesten van Antwerpen 18 percelen van Belgische telers bemonsterd. De percelen werden in de periodes 31 maart tot 9 april 2010, 21 maart tot 1 april 2011 en 19 maart tot 3 april 2012 bemonsterd om het verband te onderzoeken tussen de aanwezigheid van *Stemphylium vesicarium* tijdens het late voorjaar op de grond van de boomgaard en het optreden van zwartvruchtrot later in het groeiseizoen.

In 2010 werd DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* in 11 monsters van de in totaal 78 bemonsterde percelen aangetoond. In 2011 waren 8 monsters van de in totaal 92 bemonsterde percelen positief. In geen van deze percelen was meer dan 1% van de bladeren of vruchten aangetast. In 2012 waren 19 van 106 bemonsterde percelen positief en werd bij 14 van de 106 bemonsterde percelen een ziekte incidentie op bladeren van 1% of hoger waargenomen. Het percentage percelen met bladaantasting bij de percelen waarbij in het voorjaar *Stemphylium vesicarium* werd gedetecteerd, verschilde statistisch betrouwbaar van het percentage percelen met bladaantasting bij de percelen waarbij het pathogeen niet werd gedetecteerd. In 10 (52.6%) van de 19 percelen waarin *Stemphylium vesicarium* werd gedetecteerd in het voorjaarsmonster en 4 (4.6%) van de 87 percelen waarbij *Stemphylium vesicarium* niet werd gedetecteerd, werden symptomen van zwartvruchtrot waargenomen op de bladeren. Op vruchten van 3 percelen werd een ziekte incidentie van 1% of hoger gevonden. In de monsters van afgestorven plantenweefsels uit deze percelen was *Stemphylium vesicarium* gedetecteerd.

De resultaten geven aan dat percelen waar in het voorjaar *Stemphylium vesicarium* aangetoond kan worden in afgestorven plantenweefsels een hoger risico hebben op het optreden van zwartvruchtrot. Of bij een verhoogd risico de ziekte uiteindelijk optreedt, hangt af van diverse factoren. Het weersverloop is een bepalende factor. Toepassing van de toets heeft economische meerwaarde voor telers en ondersteunt de ontwikkeling van een duurzame productie. Inzicht in het risico op zwartvrucht in zijn boomgaard zal de teler ondersteunen in het nemen van beslissingen over spuitschema's en andere preventieve maatregelen. Gebaseerd op de resultaten van het project heeft BLGG AgroXpertus, in samenwerking met Fruitconsult, in maart 2013 telers de mogelijkheid geboden de in hun boomgaard aanwezige gewasresten te laten testen op aanwezigheid van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium*.

1. Inleiding

Zwartvruchtrot van peer wordt veroorzaakt door *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. G. Simmons (geslachtelijke vorm: *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh.) De schimmel kan zowel vruchten als bladeren aantasten (Llorente *et al.*, 2006; 2012). Peren met symptomen van zwartvruchtrot zijn onverkooftbaar of in geval van zeer kleine vlekjes in lagere klassen ingedeeld. De ziekte was al aan het eind van de jaren zeventig van de vorige eeuw aanwezig in Zuid-Europa (Ponti *et al.*, 1982). In 1997 werd zwartvruchtrot voor het eerst waargenomen in Nederland (Polfliet, 2002). Om verliezen tegen te gaan wordt door veel telers veelvuldig gespoten met fungiciden (Llorente *et al.*, 2006). Verscheidene experimenten hebben aangetoond dat in boomgaarden op de grond liggende infectiebronnen een belangrijke rol spelen in de epidemiologie van zwartvruchtrot van peer. De Jong & Heijne (2008) dekten in de periode tussen de bloei van de bomen en de oogst een deel van de grond van een peren-boomgaard af met plastic. In de delen van de boomgaard zonder plastic dek was de incidentie van zwartvruchtrot hoger dan in de delen waarbij de grond wel was afgedekt. Sanitaire maatregelen, zoals het verwijderen van de afgevallen bladeren en vruchten, of het bespuiten van deze gewasresten met antagonisten verminderde de aantasting van vruchten door zwartvruchtrot met 30 tot 60% (Llorente *et al.*, 2010). Een combinatie van deze maatregelen was zelfs effectiever.



Figuur 1. Aantasting van perenvruchten door *Stemphylium vesicarium* (zwartvruchtrot).



Figuur 2. Aantasting van perenblad door *Stemphylium vesicarium* (zwartvruchtrot).



Figuur 3. Gewasresten van peer als potentiële bron van *Stemphylium vesicarium* (zwartvruchtrot).



Figuur 4. Gewasresten van gras en onkruiden als potentiële bron van *Stemphylium vesicarium* (zwartvruchtrot).

Het pathogeen is aangetroffen op de grond van boomgaarden in dode bladeren en vruchten van perenbomen, maar ook in resten van afgestorven onkruiden en grassen (Rossi *et al.*, 2005, Köhl *et al.*, 2009a). Op dergelijke plantenresten kunnen in de loop van het hele groeiseizoen, van april tot november, ascosporen en conidia worden gevormd (Rossi *et al.*, 2008). De aanwezige plantenresten op de grond van boomgaarden worden beschouwd als continue bron van conidia die gedurende het gehele groeiseizoen infecties kunnen veroorzaken op bladeren en vruchten. De conidia en ascosporen spelen beide ook een belangrijke rol in de voortdurende verspreiding van het pathogeen tussen de aanwezige plantenresten op de grond van de boomgaard (Llorente *et al.*, 2012). Gedetailleerde kwantitatieve studies toonden het vermogen aan van *Stemphylium vesicarium* om afgestorven bladeren van peer, grassen en verscheidene kruidachtige planten te koloniseren en hierop conidia te produceren (Rossi *et al.*, 2005).

S. vesicarium komt algemeen voor als saprofyt op plantenresten (Hudson, 1971). Bepaalde stammen van de schimmel kunnen op een breed scala van gewassen, zoals peer, ui en asperge (Aveling & Snyman, 1993; Falloon *et al.*, 1987) ziekte veroorzaken. In het kader van het door LNV gefinancierde project 'Zwartvruchtrot in de geïntegreerde en biologische teelt van peren: Bronnen en verspreiding van de ziekteverwekker *Stemphylium vesicarium* in Nederland' (Looptijd 2003 - 2006) is gevonden dat isolaten van *Stemphylium vesicarium* uit aangetaste asperges en uien geen symptomen veroorzaakten op peer. In dit onderzoek werden ook saprofytische isolaten van *Stemphylium vesicarium* gevonden die niet in staat waren om peer te infecteren. Het DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* isolaten, afkomstig uit geïnfecteerde bladeren en vruchten van perenbomen of van dood bladweefsel van grassen in grasbanen van perenboomgaarden, kon van het DNA van andere *Stemphylium vesicarium* isolaten onderscheiden worden met behulp van Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). De resultaten van deze moleculaire studie is gebruikt om een kwantitatieve PCR-toets te ontwikkelen voor peer-pathogene isolaten van *Stemphylium vesicarium* (Köhl *et al.*, 2009b). Deze toets is gebruikt om de hoeveelheid peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* te bepalen in veldmonsters van plantenresten.

In het kader van het door LNV/EL&I gefinancierd project "Lokaliseren en terugdringen van zwartvruchtrot in de boomgaard" (BO-06-013-001.13, looptijd: 2009 - 2011), werden in verschillende regio's van Nederland tien perenboomgaarden geselecteerd waarin in het jaar 2008 symptomen van zwartvruchtrot waren waargenomen op bladeren en vruchten van cultivar Conference. In augustus 2009 en april 2010 werden resten van verschillende typen dood plantenweefsel bemonsterd om hun mogelijke rol als infectiebron van *Stemphylium vesicarium* te onderzoeken. Twee van de boomgaarden werden van februari 2009 tot mei 2011 maandelijks bemonsterd om de populatie dynamica van *Stemphylium vesicarium* te bestuderen. De volgende substraten bemonsterd (mits aanwezig): resten van afgevallen perenbladeren, peren of mummies op de bodem van de boomgaard, dood blad van grassen in de zwartstrook en de grasbaan en dode onkruiden. In alle monsters is de hoeveelheid peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* gemeten met behulp van de eerder ontwikkelde kwantitatieve PCR-toets (TaqMan-PCR).

De monitoring in Nederlandse boomgaarden bevestigde dat afgevallen bladeren en vruchten van perenbomen, als ook dode bladeren van grassen en afgestorven onkruiden beschouwd moeten worden als de belangrijkste besmettingsbron van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* (Köhl *et al.*, 2009a, b; Rossi *et al.*, 2005, 2008). Het pathogeen werd zelden gevonden in snoeihout en compost, organisch materiaal wat in aanzienlijke hoeveelheden aanwezig is in veel boomgaarden. In de twee boomgaarden, die van februari 2009 tot mei 2011 maandelijks werden bemonsterd, werd het DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* in hoge concentraties gevonden in afgevallen bladeren, echter de concentratie van het DNA van de ziekteverwekker in dode bladeren nam in de loop van oktober en november snel af. Deze ontwikkeling van de populatie peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* werd in de herfst van zowel 2009 en 2010 gevonden in beide gemonitorde boomgaarden. In eerder uitgevoerd onderzoek werd een vergelijkbare afname waargenomen (Köhl *et al.*, 2009b). Merkwaardigerwijs nam de hoeveelheid *Stemphylium vesicarium* in de bladeren af voordat bladvertering zichtbaar werd. Mogelijk wordt de ziekteverwekker verdrongen door de primaire saprofytische koloniseerders van verouderende bladeren. De combinatie van de afname van de hoeveelheid pathogeen en de vertering van het blad zal in het vroege voorjaar vaak leiden tot lage inoculum-dichtheden van *Stemphylium vesicarium* op bladmateriaal. In één van de twee gemonitorde boomgaarden werd in februari 2009 echter bijna 50 pg DNA van *Stemphylium vesicarium* per mg bladweefsel gevonden. Dit geeft aan dat de hoeveelheid van het pathogeen niet altijd afneemt tot lage of niet-detecteerbare concentraties. DNA van *Stemphylium vesicarium* werd ook in hoge concentraties gevonden in resten van onkruid en gras. Afgestorven

weefsels van dit type planten waren het hele groeiseizoen in wisselende hoeveelheden aanwezig. Ook in deze substraten varieerde de concentratie *Stemphylium vesicarium* gedurende het seizoen aanzienlijk. Verder was de populatie van *Stemphylium vesicarium* veelal niet gelijkmatig verdeeld over de boomgaard. Zo werd in één van de onderzochte boomgaarden in een aantal monsters van een bepaald onkruid het DNA van *Stemphylium vesicarium* gedetecteerd in concentraties van meer dan 100 pg DNA van *Stemphylium vesicarium* per mg weefsel, terwijl in andere monsters van dit onkruid uit dezelfde boomgaard geen DNA van het pathogeen werd gedetecteerd. De resultaten van het in de zomer uitgevoerde onderzoek aan de saprophytische fase van *Stemphylium vesicarium* op plantenresten geven aan dat in de loop van de tijd en per locatie grote verschillen te verwachten zijn. Als gevolg hiervan kan het patroon van zwartvruchtrot epidemieën in de loop van de tijd en per locatie sterk verschillen omdat het verloop van zwartvruchtrot epidemieën afhangt van het inoculum dat tijdens het groeiseizoen op de grond van de boomgaard wordt geproduceerd (Llorente *et al.*, 2012).

2. Doelstelling

Zwartvruchtrot in peer, veroorzaakt door bepaalde stammen van de schimmel *Stemphylium vesicarium*, treedt in de Nederlandse perenteelt alleen in enkele boomgaarden op (ongeveer 5 % van het areaal), maar het optreden van de ziekte is niet voorspelbaar en zware aantastingen treden elk jaar weer op in percelen waarin dat niet verwacht wordt. Dit heeft tot gevolg dat op het gehele areaal preventief zware spuitschema's gehandhaafd worden.

Recentelijk is door Plant Research International (in een LNV project) een op DNA-technieken berustende toets ontwikkeld die de voor peer pathogene stammen van *Stemphylium vesicarium* kan onderscheiden van de andere stammen van de schimmel (Köhl *et al.*, 2009b). De laboratoriumtoets is geschikt voor het meten van de hoeveelheid van peer-pathogene stammen in praktijkmonsters, bijvoorbeeld in perenblad en gewasresten in de zwartstroken van perenboomgaarden.

In het project is de toepassing van de door PRI ontwikkelde toets onderzocht met als doel een onderscheid te kunnen maken tussen percelen met een laag en een hoog risico met betrekking tot het optreden van zwartvruchtrot. In het project hebben Fruitconsult (teelt/gewasbeschermings-advies), BLGG (commercieel aanbieder van toetsen in de agrarische sector) nauw samengewerkt met PRI en PPO.

Indien een betrouwbare voorspelling mogelijk blijkt, kan een teler beslissen minder zware spuitschema's te hanteren in percelen met een laag risico. Dit kan - gezien het grote aandeel percelen waarin uiteindelijk geen zware aantasting door zwartvruchtrot optreedt - leiden tot een grote vermindering van de milieubelasting(spunten) en van mogelijke residuen op fruit.

3. Materiaal en methode

3.1 Keuze percelen

In 2010 en 2011 werden respectievelijk 78 en 92 percelen peer van cv. Conference geselecteerd in boomgaarden verspreid over verschillende fruitteeltregio's in Nederland. In 2012 werden in dezelfde regio's 88 percelen onderzocht. Daarnaast werden in het laatste jaar (2012) in de grensstreek ten noordwesten van Antwerpen 18 percelen van Belgische telers bemonsterd. In respectievelijk 58, 69 en 83 van de in die jaren bemonsterde percelen werden in het recente verleden door telers en teeltadviseurs symptomen van zwartvruchtrot waargenomen op bladeren en vruchten. De percelen werden in de periodes 31 maart tot 9 april 2010, 21 maart tot 1 april 2011 en 19 maart tot 3 april 2012 bemonsterd om het verband te onderzoeken tussen de aanwezigheid van *Stemphylium vesicarium* tijdens het late voorjaar in op de grond van de boomgaard liggende gewasresten en afgestorven onkruiden en het optreden van zwartvruchtrot later in het groeiseizoen. Alle percelen bevonden zich in gangbare boomgaarden waar ziekten en onkruiden met fungiciden en herbiciden werden bestreden.

3.2 Bemonstering en waarnemingen

In 2010 werd naast de middelste bomenrij van elk van de 75 onderzochte percelen een monsterstrook uitgezet. De bemonsterde strook grond was 25 m lang en de breedte was gelijk aan de afstand tussen twee rijen perenbomen. In de zwartstroken aan weerszijden van de monsterstrook werden uit 10 plotjes van ongeveer 15 x 15 cm stukjes dood weefsel (dode perenbladeren, afgevallen mummies, rotte vruchten, dood gras en stukjes afgestorven onkruid) verzameld. Uit elk van de 5 gelijkmatig over de zwartstrook verdeelde plotjes werd ongeveer 100 ml weefsel verzameld. De verschillende types dood weefsel werden niet apart gehouden, maar door elkaar gemengd. Wanneer de hoeveelheid dood materiaal in de zwartstrook niet toereikend was, werd het deelmonster aangevuld met materiaal uit de aangrenzende grasbaan. Het materiaal afkomstig uit de 10 plotjes werd samengevoegd tot één monster.

In 3 van de in 2010 bemonsterde boomgaarden werd in een perceel, waarin in 2009 veel zwartvruchtrot werd gevonden, ook intensievere bemonsteringschema's gehanteerd. Op een oppervlak van circa 400 m² werden in 3 herhalingen uit 4 - 5 monsterstroken per herhaling 10, 20 en 40 deelmonsters verzameld. De analyse van de resultaten van deze intensieve bemonsteringen lieten zien dat de analyse van een mengmonster van 40 deelmonsters de beste optie is.

Vervolgens werd in 2011 en 2012 in alle percelen het intensieve bemonsteringschema gehanteerd met 40 deelmonsters uit 4 - 5 monsterstroken. Wanneer het perceel ook in 2010 was bemonsterd, werd de monsterstrook van dat jaar opgenomen in het nieuwe bemonsteringsschema. Tussen de monsterstroken lagen, afhankelijk van de perceelgrootte, 3 tot 4 grasbanen. Het materiaal van de 40 deelmonsters werd samengevoegd tot één monster.

In de drie jaren van het onderzoek werd eind augustus de aantasting door zwartvruchtrot beoordeeld.

In boomgaarden met bomen die als spil gesnoeid waren, werd de mate van aantasting bij 30 bomen per monsterstrook beoordeeld. In boomgaarden met andere boomtypen werden 10 bomen per monsterstrook beoordeeld. Alleen vruchten en bladeren die vanaf de grasbaan zichtbaar waren werden beoordeeld. Het aantal gezonde, als ook het aantal vruchten met symptomen van zwartvruchtrot werd geteld. De mate van bladaantasting werd bepaald door per boom het aantal bladeren met symptomen van zwartvruchtrot te tellen van 10 bladeren aan 2 langloten.

3.3 DNA analyse

De monsters werden in plastic zakken vervoerd en in een diepvriezer bewaard totdat zij werden verwerkt. Het materiaal in de monsters werd in bevroren toestand versnipperd en gevriesdroogd. De gedroogde monsters werden vervolgens tot poeder gemalen. Uit 15 tot 50 mg poeder werd het DNA geëxtraheerd. De in de extracten aanwezige hoeveelheden DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* werd gemeten met TaqMan-PCR toetsen (Köhl *et al.*, 2009b). Met behulp van een ijklijn werd de concentratie van het pathogeen berekend.

4. Resultaten

4.1 Bemonstering en monsteropwerking

In 2010 werden de resultaten van 3 bemonsteringschema's met 10, 20 en 40 deelmonsters afkomstig uit een perceelsdeel met een oppervlak van circa 400 m² met elkaar vergeleken. De analyse van de resultaten van dit onderzoek laten zien dat een mengmonster van 40 deelmonsters de hoogste kans geeft op detectie van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium*.

Het protocol voor de extractie van het DNA uit gemalen monsters werd in 2011 geoptimaliseerd. Uiteindelijk werden alle in de loop van de 3 projectjaren verzamelde monsters met de geoptimaliseerde extractiemethode verwerkt. Alleen de analyses van de data verkregen met de verbeterde methode voor DNA extractie worden in dit verslag gepresenteerd.

4.2 Toetsing van voorjaarsmonsters op DNA van *Stemphylium vesicarium*

In 2010 werd DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* in 11 monsters van de in totaal 78 bemonsterde percelen aangetoond (Tabel 1). Het gemiddelde van de concentraties in de 11 positieve monsters was 623 pg DNA mg⁻¹ plantenweefsel, de hoogste waarde was 2663 pg DNA mg⁻¹ plantenweefsel. In 2011 waren 8 monsters van de in totaal 92 bemonsterde percelen positief voor DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium*. De concentraties van ziekteverwekker lagen tussen 55 en 166 pg DNA mg⁻¹ plantenweefsel met een gemiddelde van 97 pg. In 2012 waren 19 van 106 bemonsterde percelen positief met een gemiddelde van 66 pg DNA mg⁻¹ plantenweefsel. De hoogste gevonden concentratie was 393 pg DNA mg⁻¹ plantenweefsel.

Tabel 1. Resultaten van de monitoring van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* DNA in voorjaarsmonsters van afgestorven plantenweefsels in perenpercelen.

Jaar	Aantal percelen	Aantal percelen met <i>S. vesicarium</i> positieve monsters	Concentratie <i>S. vesicarium</i> DNA in positieve monsters (pg DNA mg ⁻¹ weefsel)	
			Gemiddelde	Maximum
2010	78	11 (14) ¹	623	2663
2011	92	8 (9)	97	166
2012	106	19 (18)	66	393

¹ Tussen haakjes staat het percentage positieve percelen.

4.3 Ziektewaarnemingen voor de oogst

In de jaren 2010 en 2011 werd zwartvruchtrot slechts in enkele percelen geconstateerd. Het aantastingsniveau in deze percelen was laag. In 2010 werd in 16 van de 77 percelen (van 1 perceel ontbreken de gegevens van de bladwaarnemingen) aantasting gevonden op bladeren (Tabel 2). Bij de percelen met bladaantasting was gemiddeld 0.05 % van de bladeren aangetast, het maximum was 0.34 %. In 16 van de 78 percelen is zwartvruchtrot gevonden

op vruchten (Tabel 3). Percelen met vruchtaantasting hadden een gemiddelde aantasting van 0.19 %, het maximum was 0.89 %. In 9 percelen was sprake van zowel blad- als vruchtaantasting.

In 2011 werd in 28 van de 92 percelen bladaantasting gevonden. Bij de percelen met bladaantasting was de gemiddelde aantasting 0.24 %, het maximum was 0.95 %. In 10 van de 92 percelen werden vruchten met zwartvruchtrot gevonden. Bij percelen met vruchtaantasting was de gemiddelde aantasting 0.11 %, het maximum was 0.20 %. In 9 percelen was sprake van zowel blad- als vruchtaantasting.

In 2012 werd in 58 van 106 bemonsterde percelen bladaantasting geconstateerd. De gemiddelde aantasting in percelen met bladaantasting was 0.78 %, het maximum 5.30 %. In 36 van de 106 percelen is zwartvruchtrot gevonden op vruchten. Bij percelen met vruchtaantasting was de gemiddelde aantasting 0.43 %, het maximum was 4.43 %. In 32 percelen was sprake van zowel blad- als vruchtaantasting.

Tabel 2. Resultaten van de monitoring van zwartvruchtrot in peer voor de oogst: bladaantasting.

Jaar	Aantal percelen	Aantal percelen met bladaantasting	Aantal percelen met ≥ 1 % bladaantasting	Ziekte incidentie (%) in percelen met bladaantasting	
				Gemiddelde	Maximum
2010	78	16 (21) ¹	0	0.05	0.34
2011	92	28 (30)	0	0.24	0.95
2012	106	58 (55)	14	0.78	5.30

¹ Tussen haakjes staat het percentage positieve percelen.

Tabel 3. Resultaten van de monitoring van zwartvruchtrot in peer voor de oogst: vruchtaantasting.

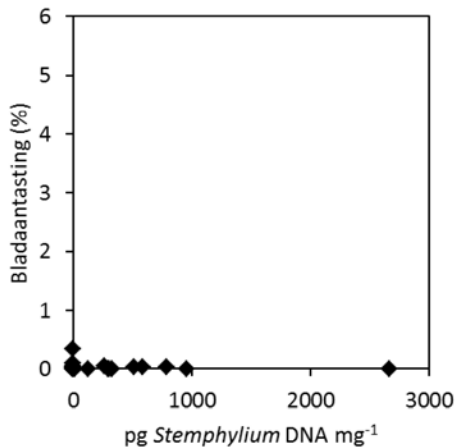
Jaar	Aantal percelen	Aantal percelen met vruchtaantasting	Aantal percelen met ≥ 1 % vruchtaantasting	Ziekte incidentie (%) in percelen met vruchtaantasting	
				Gemiddelde	Maximum
2010	78	16 (21) ¹	0	0.19	0.89
2011	92	10 (11)	0	0.11	0.20
2012	106	36 (38)	3	0.43	4.43

¹ Tussen haakjes staat het percentage positieve percelen.

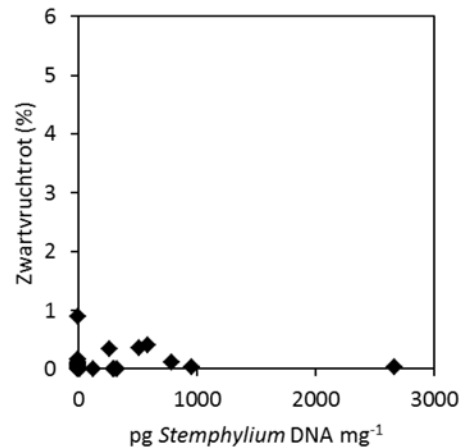
4.4 Verband tussen concentraties *Stemphylium vesicarium* DNA in voorjaarsmonsters en ziekte waarnemingen

In 2010 en 2011 werd alleen in enkele percelen en ook op een zeer laag niveau zwartvruchtrot geconstateerd (Figuur 5 – 8). In geen van deze percelen was meer dan 1% van de bladeren of vruchten aangetast. Door de lage ziekte incidenties zijn de data over die jaren niet geschikt voor het trekken van conclusies over verbanden tussen

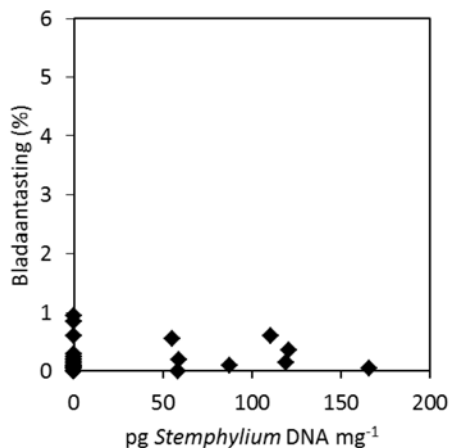
hoeveelheden DNA van *Stemphylium vesicarium* in voorjaarsmonsters van plantenresten en het uiteindelijke optreden van zwartvruchtrot in de percelen later in het seizoen. In 2012, met koel en nat weer in de maanden juni en juli, werd bij 14 van de 106 bemonsterde percelen een ziekte incidentie op bladeren van 1% of hoger ($DI \geq 1\%$) waargenomen. Het percentage percelen met bladaantasting bij de percelen waarbij in het voorjaar *Stemphylium vesicarium* werd gedetecteerd, verschilde statistisch betrouwbaar van het percentage percelen met bladaantasting bij de percelen waarbij het pathogeen niet werd gedetecteerd. In 10 (52.6%) van de 19 percelen waarin *Stemphylium vesicarium* werd gedetecteerd in het voorjaarsmonster en 4 (4.6%) van de 87 percelen waarbij *Stemphylium vesicarium* niet werd gedetecteerd, werden symptomen van zwartvruchtrot waargenomen op de bladeren. Op vruchten van 3 percelen werd een ziekte incidentie van 1% of hoger ($DI \geq 1\%$) gevonden. In de monsters van afgestorven plantenweefsels uit deze percelen was *Stemphylium vesicarium* gedetecteerd.



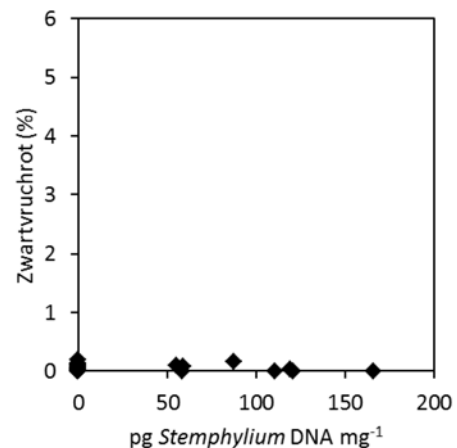
Figuur 5. Verband tussen de concentratie van *Stemphylium vesicarium* DNA in plantenresten in het voorjaar en bladaantasting. 2010, 78 percelen.



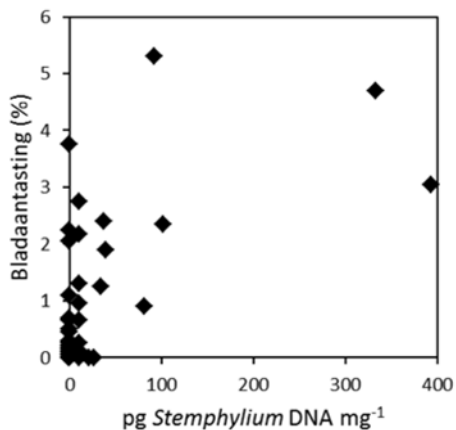
Figuur 6. Verband tussen de concentratie *Stemphylium vesicarium* DNA in plantenresten in het voorjaar en zwartvruchtrot op vruchten. 2010, 78 percelen.



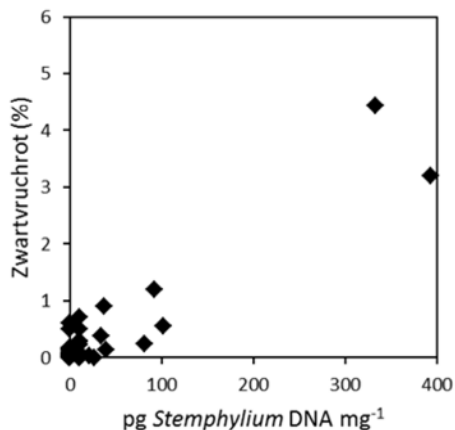
Figuur 7. Verband tussen de concentratie *Stemphylium vesicarium* DNA in afgestorven plantenweefsels in het voorjaar en bladaantasting. 2011, 92 percelen.



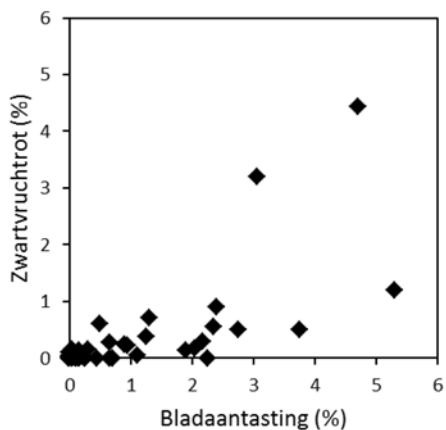
Figuur 8. Verband tussen de concentratie *Stemphylium vesicarium* DNA in afgestorven plantenweefsels in het voorjaar en zwartvruchtrot op vruchten. 2011, 92 percelen.



Figuur 9. Verband tussen de concentratie Stemphylium vesicarium DNA in afgestorven plantenweefsels in het voorjaar en bladaantasting. 2012, 106 percelen.



Figuur 10. Verband tussen de concentratie Stemphylium vesicarium DNA in afgestorven plantenweefsels in het voorjaar en zwartvruchtrot op vruchten. 2012, 106 percelen.



Figuur 11. Verband tussen bladaantasting door Stemphylium vesicarium en zwartvruchtrot op vruchten. 2012, 106 percelen.

Tabel 4. Optreden van zwartvruchtrot op bladeren en vruchten van peer op het moment van de oogst van percelen waarbij in het voorjaarsmonster van afgestorven plantenweefsels wel of geen DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* werd gedetecteerd.

Aantasting door zwartvruchtrot bij de oogst	Detectie van DNA van <i>Stemphylium vesicarium</i> in het voorjaarsmonster					
	2010 ¹		2011		2012	
	nee	ja	nee	ja	nee	ja
Op bladeren						
Aantal percelen met DI ² 0 tot < 1 %	66	11	84	8	83	9
Aantal percelen met DI ≥ 1 %	0	0	0	0	4	10
Op vruchten						
Aantal percelen met DI 0 tot < 1 %	67	11	84	8	87	16
Aantal percelen met DI ≥ 1 %	0	0	0	0	0	3

¹ van 1 perceel ontbreken de waarnemingen van de bladaantasting.

² DI: Disease Incidence; ziekte incidentie in percentage aangetaste bladeren of vruchten

5. Discussie en conclusies

De projectresultaten laten zien dat aan het begin van het groeiseizoen in ongeveer 10-20 % van de bemonsterde perenpercelen het zwartvruchtrot pathogeen in gewasresten aanwezig was. In 2010 en 2011 was het aantastingsniveau van zwartvruchtrot laag omdat het gedurende de potentiële infectieperioden zeer droog en warm was. In alle bemonsterde percelen was de aantasting van bladeren en vruchten lager dan 1 %, in de meerderheid van de bemonsterde percelen was helemaal geen symptoom van zwartvruchtrot te zien. Daarom werd in de teeltseizoenen 2010 en 2011 geen verband gevonden tussen de hoeveelheid pathogeen in het voorjaar en de mate van aantasting in de zomer. In 2012 was na koud en vochtig weer in juni en juli het percentage percelen met zwartvruchtrot hoger. In 58 van de 106 bemonsterde percelen was bladaantasting te zien, in 36 percelen vruchtaantasting. In het algemeen was het aantastingsniveau laag. Alleen in 14 percelen was meer dan 1 % van de bladeren aangetast en in 3 percelen meer dan 1 % van de vruchten. Onder de omstandigheden van 2012 bleek het wel mogelijk het al vermoede verband tussen de hoeveelheid pathogeen in het voorjaar en de mate van aantasting in de zomer aan te tonen. Van de 19 percelen waarbij *Stemphylium vesicarium* in het voorjaar werd aangetoond in plantenresten, werd in 53% van de percelen meer dan 1% van de bladeren aangetast door het pathogeen. Bij de percelen waar geen *Stemphylium vesicarium* werd aangetoond, was dit slechts in 4.6 % van de percelen het geval. In de 3 percelen waar meer dan 1% vruchtaantasting werd gevonden, was *Stemphylium vesicarium* aanwezig in het voorjaarsmonster. De resultaten geven aan dat percelen waar in het voorjaar *Stemphylium vesicarium* aangetoond kan worden in afgestorven plantenweefsels een hoger risico hebben op het optreden van zwartvruchtrot. Of bij een verhoogd risico de ziekte uiteindelijk optreedt, hangt af van diverse factoren. Het weersverloop is een bepalende factor. In 2012 was sprake van enkele vals-negatieve uitslagen van de toets (4.6% van de negatieve uitslagen). Bij een vals-negatieve uitslag kan een teeltadvies fout uitpakken: het advies zwartvruchtrot minder intensief te bestrijden, kan in een dergelijk geval een hogere aantasting tot gevolg hebben. Vals-negatieve testuitslagen moeten dus zo min mogelijk optreden. Een reden voor het optreden van vals-negatieve testuitslagen kan zijn dat de bemonsterde plots te klein waren. Het pathogeen kan afwezig geweest zijn in het bemonsterde plot, maar wel aanwezig in een naburige rij. Hoewel er geen DNA van *Stemphylium vesicarium* in het monster wordt gevonden, kan de ziekte in dergelijke gevallen toch optreden. Misschien zijn ook de mengmonsters te klein en niet representatief voor een plot. Een ander optie is dat in de vals-negatieve monsters een *Stemphylium* populatie aanwezig was die niet door de zeer specifieke toets wordt aangetoond maar wel ziekte kan veroorzaken op peer. De open vragen maken onderzoek naar een verdere optimalisatie van de toets noodzakelijk. Mogelijkerwijs kan dit in het komende seizoen gelijktijdig met de implementatie van de toets in de perenteelt stapsgewijs verder onderzocht en opgelost worden zodat de toets nog betrouwbaarder wordt.

Toepassing van de toets in de perenteelt heeft economische meerwaarde voor telers en ondersteunt de ontwikkeling van een duurzame productie. Inzicht in het risico op zwartvruchtrot in zijn boomgaard zal de teler ondersteunen in het nemen van beslissingen over spuitschema's en andere preventieve maatregelen. Fungiciden zoals Captan en Mancozeb worden veel in de Nederlandse perenteelt gebruikt voor de bestrijding schurft en andere ziekten. Omdat deze fungiciden in enige mate ook zwartvruchtrot bestrijden, kunnen telers van boomgaarden, waarvan zij weten dat het risico op zwartvruchtrot laag is, vertrouwen op deze fungiciden. In boomgaarden met een hoog risico op zwartvruchtrot kunnen telers aan het begin van de zomer in perioden met verhoogd infectie risico andere fungiciden, zoals Bellis, Flint, Score, Stroby of Switch opnemen in het spuitprogramma (de Jong *et al.*, 2007a). Op dit moment is het in Nederland algemeen gebruik om met deze fungiciden te spuiten om zwartvruchtrot infecties te vermijden (de Jong *et al.*, 2004, 2006, 2007b, 2011). Het onderzoek aan percelen peer in de periode 2010-2012 toonde aan dat *Stemphylium vesicarium* in slechts 9 tot 18% van de bemonsterde percelen wordt gedetecteerd. In deze situatie waren in de meeste boomgaarden de extra, speciaal tegen zwartvruchtrot gerichte preventieve fungicide-besputtingen mogelijk overbodig. Wanneer deze overbodige besputtingen niet waren uitgevoerd, zouden de telers minder kosten gemaakt hebben en zouden er minder residuen op de geoogste vruchten hebben gezeten. Het spuiten met een specifiek tegen zwartvruchtrot gericht fungicide met een combinatie van twee actieve stoffen verhoogt de kans op het detecteren van residuen van meerdere bestrijdingsmiddelen op het geoogste fruit. Voor de afzet via Europese supermarkten is het aantal residuen van verschillende chemische gewasbeschermingsmiddelen, naast de totale hoeveelheid residu, een belangrijk criterium. Naast beslissingen over spuitschema's, kunnen telers

ook besluiten tot extra fyto-sanitaire maatregelen in boomgaarden met een hoog risico op zwartvruchtrot. Het mechanisch verwijderen van bladeren en andere plantenresten uit de boomgaard, of het bevorderen van de vertering ervan, zijn maatregelen die in een dergelijke situatie economisch haalbaar kunnen zijn (Llorente *et al.*, 2010).

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* bladeren van peer en afgestorven weefsels van onkruiden en grassen kan koloniseren. De dynamiek van de aanwezigheid van deze substraten op de bodem van de boomgaard in combinatie met de natuurlijke afname van de dichtheden van *Stemphylium vesicarium* in de loop van de winter, zijn een mogelijke verklaring voor de onvoorspelbaarheid van zwartvruchtrot-epidemieën in individuele boomgaarden, zelfs in die gevallen waarbij de ziekte in het voorafgaande seizoen aanwezig was. Een voorspelling op basis van de bepaling van de hoeveelheid DNA van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium* in het voorjaar biedt telers misschien een mogelijkheid om hun gewasbeschermingsstrategie aan te passen.

Gebaseerd op de resultaten van het project 'Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer' heeft BLGG AgroXpertus, in samenwerking met Fruitconsult, in maart 2013 telers de mogelijkheid geboden de in hun boomgaard aanwezige gewasresten van peer en de afgestorven resten van onkruiden en grassen te laten testen op aanwezigheid van peer-pathogene *Stemphylium vesicarium*. Het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de snelle afname van de populatiedichtheid van het pathogeen op plantenresten, zeer waarschijnlijk concurrerende micro-organismen (Köhl & Fokkema, 1998), verdient nader onderzoek. De uit dit onderzoek verkregen kennis kan leiden tot verbeterde methoden voor de biologische bestrijding van op plantenresten aanwezige populaties van het pathogeen (Rossi & Patteri, 2009; Llorente *et al.*, 2010). Bovendien is meer onderzoek nodig om de methode voor de voorspelling van het risico op zwartvruchtrot te valideren door telers de ontwikkelde toets meerdere jaren te laten gebruiken. Verder is ook onderzoek nodig om het aantal vals-negatieve testresultaten te verminderen.

6. Producten opgeleverd gedurende het project

Doelstellingen van het project en projectresultaten zijn gecommuniceerd en besproken met de sector door een presentatie van een poster en hand-outs op de Kennisdag voor de fruitteelt 2010 en 2011 en een mondelijke presentatie op de Kennisdag voor de fruitteelt 2012. Ook is het project beschreven in een artikel verschenen in Fruitteelt. Hand-outs zijn verstuurd naar alle bij het project betrokken telers en Fruitconsult heeft jaarlijks de resultaten van de metingen gecommuniceerd naar de betrokken bedrijven. Begin 2013 zijn de projectresultaten besproken met telers in een serie van presentaties door Fruitconsult. Zwartvruchtrot is uitgebreid aan de orde gekomen op de volgende gewasbeschermings-bijeenkomsten:

25 februari – Kruisland – NW-Brabant (organisatie FC),
 27 februari – Bunnik – Utrecht (organisatie FC),
 28 februari – Geldermalsen – Betuwe West (organisatie FC),
 4 maart – Benschop – Vecht en IJsselstreek (organisatie NFO),
 7 maart – Westwoud – Noord-Holland (organisatie FC).

Begin 2013 zijn de projectresultaten door de projectpartners Plant Research International, Fruitconsult en BLGG Research gepresenteerd aan BLGG AgroXpertus en zijn de kansen en knelpunten voor de implementatie van de ontwikkelde toets in de Nederlandse perenteelt besproken. De details van de bemonstering- en analysetechnieken zijn overgedragen. BLGG AgroXpertus beoogt een proefjaar in 2013. De toets wordt in 2013 tegen kostprijs aangeboden aan telers om de nodige ervaringen op te doen voordat een beslissing over een commerciële toepassing kan worden genomen.

Referenties

Balkhoven, H. & J. Köhl, 2012.

Vruchtrot vroegtijdig voorspellen: utopie of realiteit. Fruitteelt 102 (7): 12-13.

Köhl, J., J. Wubben, P.F. de Jong, P.F. & H. Balkhoven, 2012.

CSI Zwartvruchtrot. Kennisdag voor de fruitteelt 2012, Wageningen, The Netherlands, 9 november 2012. Mondelijke presentatie.

Köhl, J., P. Kastelein, L. Groenenboom-de Haas, H. Balkhoven, J. Wubben & P.F. de Jong, 2010.

Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer. Kennisdag voor de fruitteelt 2010, Wageningen, The Netherlands, 26 november 2010. Poster.

Köhl, J., P. Kastelein, L. Groenenboom-de Haas, H. Balkhoven, J. Wubben & P.F. de Jong, 2011.

Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer. Kennisdag voor de fruitteelt 2011, Wageningen, The Netherlands, 2 december 2011. Poster.

7. Literatuur

- Aveling, T.A.S. & H.G. Snyman, 1993.
Infection studies of *Stemphylium vesicarium* on onion leaves. *Mycological Research*, 97, 984-988.
- Falloon, P.G., L.M. Falloon & R.G. Grogan, 1987.
Etiology and epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and purple spot of asparagus in California. *Phytopathology*, 77, 407-413.
- Hudson, H.J., 1971.
The development of the saprophytic fungal flora as leaves senesce and fall. (In T. F. Preece & C. H. Dickinson (Eds.), *Ecology of leaf surface micro-organisms* (pp. 447-455). London and New York: Academic Press.)
- Jong, P.F. de, & Heijne, B. (2007).
Overwintering van zwartvruchtrot. *Randwijk : Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, -rapportnr. 2007-20.*
- Jong, P.F. de & B. Heijne, 2008.
Exclusion of the inoculum source of brown spot (*Stemphylium vesicarium*). *Acta Horticulturae*, 800, 833-838.
- Jong, P.F. de, A. Boshuizen, M. van Dieren, R. Anbergen & B. Heijne, 2007a.
Sporevangsten vergeleken met infectiemomenten. *Randwijk: Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, -rapportnr. 2007-04.*
- Jong, P.F. de, J.J. Simonse & R.H.N. Anbergen, 2004.
Middelenproef tegen zwartvruchtrot (*Stemphylium vesicarium*). *Randwijk: Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, diverse rapporten -rapportnr. 2004-47D, 2006-29, 2007-34.*
- Jong, P.F. de, J.J. Simonse & R.H.N. Anbergen, 2006.
Middelenproef tegen zwartvruchtrot (*Stemphylium vesicarium*). *Randwijk : Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, diverse rapporten -rapportnr. 2006-29.*
- Jong, P.F. de, J.J. Simonse & R.H.N. Anbergen, 2007b.
Middelenproef tegen zwartvruchtrot (*Stemphylium vesicarium*). *Randwijk: Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, diverse rapporten -rapportnr. 2007-34.*
- Jong, P.F. de; M.J. de Vlas, J.M.T. Balkhoven-Baar & R.H.N. Anbergen, 2011.
Bestrijding zwartvruchtrot (*Stemphylium vesicarium*). *Randwijk: Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bloembollen Boomkwekerij & Fruit, -rapportnr. 2011-05.*
- Köhl, J. & N.J. Fokkema, 1998.
Biological control of necrotrophic foliar fungal pathogens. In: Boland, G.J. & L.V. Kuykendall (eds.) *Plant-Microbe Interactions and Biological control*, Marcel Dekker, New York, pp. 49-88.
- Köhl, J., B.H. Groenenboom-de Haas, H.M. Goossen-van de Geijn, A. Speksnijder, P. Kastelein, S. de Hoog & B. Gerrits van der Ende, 2009a.
Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 151-162.
- Köhl, J., B.H. Groenenboom-de Haas, P. Kastelein, V. Rossi & C. Waalwijk, 2009b.
Quantitative detection of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. *Phytopathology*, 99, 1377-1386.
- Llorente, I. & E. Montesinos, 2006.
Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90, 1368-1375.
- Llorente, I., C. Moragrega, L. Ruz & E. Montesinos, 2012.
An update on control of brown spot of pear. *Trees*, 26, 239-245.
- Llorente, I., A. Vilardell, P. Vilardell, E. Patteri, R. Bugiani, V. Rossi & E. Montesinos, 2010.
Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 127-141.
- Polfliet, M., 2002.
Aantasting *Stemphylium* neemt met het jaar toe [Infection of *Stemphylium* increases every year]. *Fruiteelt*, 92 (20), 16-17. (in Dutch)

Ponti, I., P. Cavanni & A. Brunelli, 1982.

Maculatura bruna delle pere: eziologia e difesa. *Informatore Fitopatologico*, 32, 35-40. (in Italian)

Rossi, V. & E. Patteri, 2009.

Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biological Control* 49, 52-57.

Rossi, V., E. Patteri, S. Giosué & R. Bugiani, 2005.

Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 361-370.

Rossi, V., E. Patteri & R. Bugiani, 2008.

Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 147-159.